The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Pasteurella multocida毒素に結合する宿主細胞成分に関する研究
Author(s)	大西, 貴弘
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41775
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【 7 】

氏　　名	大西貴弘（おおにしたかひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　14945　号
学位授与年月日	平成11年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科　病理系専攻
学位論文名	*Pasteurella multocida* 毒素に結合する宿主細胞成分に関する研究
論文審査委員	（主査） 教授　本田　武司 （副査） 教授　杉本　央　　教授　木下タロウ

論文内容の要旨

[目的]

Pasteurella multocida は哺乳動物や鳥類の上部気道、口腔内に存在し、時に肺炎、敗血症その他の多種多様な疾患の原因となる。とくにヒトのパスツレラ症は、犬猫等による咬傷、掻傷から感染する人畜共通伝染病として知られている。本菌は血清型による分類とは独立して、分子量約150 kDa の毒素（PMT）を産生する毒素原性菌と産生しない非毒素原性菌に区別される。PMT は致死性の毒素で皮内投与により皮膚壊死を起こすことから壊死毒素とも呼ばれている。パスツレラによる豚の進行性萎縮性鼻炎で見られる鼻甲介骨の萎縮に関与していると考えられている。細胞レベルにおいては PMT はマウス線維芽細胞 Swiss 3T3に強い増殖促進活性を示し、ラット線維芽細胞 Rat-1に足場非依存性増殖を促進する。また、骨芽細胞に作用してその分化を抑制することが知られている。さらに PMT が細胞内のイノシトールリン酸産生を促進し、細胞内カルシウム濃度を上昇させることなどが報告されている。しかし、PMT の生物活性の背景となる分子作用機序は明らかにされていない。そこで、本研究では PMT の作用機序を解析するため、PMT と直接相互作用を示す細胞タンパク質の検出を試みた。

[方法ならびに成績]

PMT の作用を、PMT と生物活性において共通点が多い *Bordetella bronchiseptica* の皮膚壊死毒素（DNT）の作用と比較した。DNT は細胞内の低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho を標的分子とし、これを脱アミド化することが既に明らかになっている。そこで PMT の Rho に対する作用を検討した。マウス骨芽細胞 MC3T3-E1を毒素処理して Rho に制御されているアクチン線維の収束を観察した。その結果 PMT は DNT と同様にアクチン線維の収束を促進し、PMT 作用による Rho の活性化が示唆された。DNT が細胞内の Rho を脱アミド化すると SDS-PAGE 上の Rho の移動度が変化するのに対して、PMT 処理した細胞の Rho ではそのような変化は認められなかった。以上のことから、PMT は Rho を活性化するが、DNT のような Rho に対する脱アミド化作用は示さないことが明らかとなった。

次に PMT と結合する細胞タンパク質を検索するため、PMT をプローブとしたリガンドオーバーレイアッセイを行った。その結果、感受性細胞 Swiss 3T3の細胞破砕液から PMT と特異的に結合する分子量約60 kDa のタンパク質

(p60) が検出された。さらに、PMT を用いた免疫沈降法により ^{35}S で標識した Swiss 3T3の細胞破砕液から PMT と共に沈降する同様のタンパクが確認された。p60の性質を知るために Swiss 3T3 を可溶性画分と不溶性画分に分画したところ、p60は不溶性画分から検出された。また、マウスの脳、肝臓、腎臓を用いて p60の検出を試みたが、いずれの組織からも検出されなかった。

多くの培養細胞では単層状態で PMT 処理すると、細胞は特徴的な凝集像を示す。そこで、この形態変化と p60との関係を検討した。種々の培養細胞に100 ng/ml の毒素を 2 時間から12時間作用させたところ、Swiss 3T3、Rat-1、C3H10T1/2、Cos-7 細胞では著しい形態変化が観察された。しかし、Hep3B 細胞は PMT と共に 7 日間培養しても形態変化を起こさなかった。これらの細胞からリガンドオーバーレイアッセイによって p60の検出を試みたところ、形態変化を起こす Swiss 3T3、Rat-1、C3H10T1/2、Cos-7細胞からは p60が検出されたが、形態変化を起こさない Hep3B 細胞からは検出されなかった。この結果から、p60は PMT による細胞の形態変化と密接に関係する細胞成分であることが示唆された。

[総括]

PMT の作用機序解明のため PMT と相互作用を示すタンパク質の検出を試みた。最初に PMT と共通する生物活性を持つ DNT の標的分子 Rho に対する PMT の作用を検討した。その結果、PMT の作用を受けた細胞内では Rho が活性化されていることがわかった。しかし PMT と Rho の直接的な相互作用は確認できず、PMT は DNT とは異なった様式で Rho を活性化していると考えられた。一方、リガンドオーバーレイアッセイにより PMT と特異的に結合する p60が検出された。p60は PMT 処理によって形態変化を起こす細胞からのみ検出され、形態変化を起こさない細胞からは検出されなかった。これらの結果から、p60は PMT による細胞の形態変化と密接に関係する細胞成分であることが示唆された。p60は不溶性画分に存在すると考えられる。細胞の不溶性画分には細胞膜や細胞小器官、あるいは細胞骨格成分が含まれている。細胞の形態は多種類の細胞骨格成分に維持されていることから考えて、今後、PMT の作用による細胞骨格の変化に焦点を置いて P60と細胞形態変化との関わりを調べていく必要があると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Pasteurella multocida の産生する PMT は分子量約150 kDa のタンパク毒素である。PMT は培養細胞の DNA 合成を促進し、骨芽細胞の分化抑制や破骨細胞の活性化を引き起こすことが知られている。しかしながら、PMT の生物活性の背景となる分子作用機序は明らかにされていない。そこで、本研究では PMT と直接相互作用を示す細胞タンパク質の検出を試みた。まず、PMT の作用を PMT と生物活性において共通点が多い Bordetella bronchiseptica の皮膚壊死毒素(DNT)の作用と比較した。その結果、PMT は Rho によって制御されているアクチン線維の重合を促進し、PMT が Rho を活性化している事が示唆された。しかし、DNT が細胞内の Rho を直接修飾し、SDS-PAGE 上の Rho の移動度を変化させるのに対して、PMT 処理した細胞の Rho ではそのような変化は認められなかった。これらの事から PMT と DNT は見かけ上、生物活性は非常によく似ているが、その作用様式は異なっている事が示唆された。また、PMT の感受性細胞からリガンドオーバーレイアッセイによって PMT と特異的に結合するタンパクの検出を試みたところ、分子量約60 kDa のタンパク (p60) が検出された。この p60は PMT の作用により形態変化が起こる細胞のみから検出されたため、PMT による形態変化と密接に関係する宿主細胞成分である事が示唆された。

以上の結果は PMT の作用機序を理解する上で興味深い知見であるだけでなく、*Pasteurella multocida* の病原性解明に大きく貢献するもので、学位の授与に値すると考えられる。